

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Medicina Materno-Infantile dell'età evolutiva e
Fisiopatologia dello sviluppo sessuale

Ciclo XXIII

Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: MED/38 PEDIATRIA
GENERALE E SPECIALISTICA

TITOLO TESI

NGAL URINARIA COME MARKER DI ACUTE
KIDNEY INJURY IN VERY LOW BIRTH WEIGHT
INFANTS

Presentata da: Dott.ssa Chiara Locatelli

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Luigi Bolondi

Prof. Giacomo Faldella

Esame finale anno 2011

INDICE

INTRODUZIONE	pag 3
-AKI e neonati pretermine VLBW	pag 3
-Definizione e diagnosi di AKI	pag 6
- Necessita' di nuovi marker precoci di AKI	pag 11
- NGAL neutrophil gelatinase-associated lipocalin	pag 11
OBIETTIVI DELLO STUDIO	pag 20
-Pazienti	pag 20
-Materiali e Metodi	pag 21
RISULTATI	pag 22
DISCUSSIONE	pag 31
BIBLIOGRAFIA	pag 35

INTRODUZIONE

AKI e neonati pretermine VLBW

L'Acute Kidney Injury (AKI) e' una patologia abbastanza frequente nei neonati.¹

In periodo perinatale puo' verificarsi in associazione con la presenza di uropatia ostruttiva, l'assunzione materna di farmaci nefrotossici (uso di tocolitici come l'indometacina) o come conseguenza di grave asfissia neonatale. In periodo postnatale l'AKI puo' essere dovuta a condizioni patologiche quali sepsi, gravi anomalie cardiache, esposizione a farmaci nefrotossici, interventi chirurgici.

Nei neonati prematuri, e in particolare nei VLBW (Very Low Birth Weight, <1500 g) a cui e' dedicata questa dissertazione, l'AKI si riscontra frequentemente.

Sebbene in questi ultimi anni si e' assistito a un notevole avanzamento delle pratiche assistenziali dei VLBW con un aumento della loro sopravvivenza e miglioramento degli outcomes, una certa percentuale di mortalita'e di morbidita' rimane¹. Infatti in questa popolazione l'AKI ha un'incidenza che va dall'8 al 24% e un rischio di mortalita' tra il 10 e il 61%.³

I fattori di rischio, la diagnosi e il trattamento di AKI sono ancora poco conosciuti nella popolazione dei neonati VLBW.

AKI si presenta spesso in associazione con patologie tipiche di questo gruppo di pazienti come RDS, PDA, trattamento farmacologico o chirurgico del dotto arterioso, NEC. Inoltre AKI può insorgere con l'assunzione di farmaci potenzialmente nefrotossici in quanto questa popolazione, di neonati con età gestazionale inferiore alle 36 settimane, è considerata ad alto rischio di danno renale, perché la nefrogenesi non si è ancora completata². Altre condizioni come ipotensione, ipovolemia, ipossiemia, acidosi, possono causare AKI; un danno renale si può verificare anche come complicanza della ventilazione meccanica, della cateterizzazione della vena o dell'arteria ombelicale o della somministrazione di amine vasoattive.^{4,5}

La presenza di AKI può provocare delle complicazioni in questa fragile popolazione di prematuri.

Quando AKI si verifica nella prima settimana di vita si possono avere prolungati episodi di oliguria/anuria ed è quindi inibito il calo ponderale fisiologico. L'aumentata ritenzione di fluidi che consegue può determinare l'insorgenza o il peggioramento di patologie frequenti nel VLBW come distress respiratorio, persistenza del dotto

arterioso, e, alla lunga, favorire l'insorgenza di displasia broncopolmonare. Alcuni studi infatti, suggeriscono una associazione tra AKI e BPD, ipotizzando che AKI possa intervenire a vari livelli nell'etiopatogenesi di questa condizione. Uno dei fattori implicati e' l'iperafflusso di liquidi, gia' descritto, che puo' causare edema polmonare. Un'altra ipotesi sarebbe che AKI possa accelerare il processo di danno cronico polmonare attraverso l'induzione di mediatori infiammatori.¹ Studi su modelli animali hanno infatti dimostrato come l'AKI si associa ad un'aumentata produzione di interleuchine, TNF, radicali liberi, fattori di crescita endoteliali e fattori che stimolano la formazione di granulociti, che sono implicati nella fisiopatologia della BPD.¹

La ritenzione di liquidi causata da AKI puo' determinare inoltre iponatremia, che, in casi estremi, puo' provocare danni cellulari cerebrali tali da determinare sequele neurologiche quali sordita', paralisi cerebrale, alterazioni nelle performance cognitive.⁶

L'insorgenza di AKI in epoca neonatale puo' indurre patologie a breve termine e favorire l'insorgenza di esiti a lungo termine come insufficienza renale cronica e ipertensione.

Queste osservazioni suggeriscono che una diagnosi tempestiva e un trattamento precoce di AKI sono fondamentali nella prevenzione di morbidita' e mortalita' in questa popolazione ad alto rischio.

Definizione e diagnosi di AKI

L'Acute Kidney Injury e' una patologia complessa che si puo'presentare con diversi gradi di severita' e diversi scenari clinici¹.

La definizione di AKI nella popolazione dei prematuri VLBW e' uno dei temi piu' controversi in neonatologia.

Nel 2004 e' stata proposta una definizione di AKI per i pazienti adulti: classificazione RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, end-stage renal disease)¹¹ (Figura1) successivamente modificata per i pazienti pediatrici (pRIFLE)¹² .(Figura2)

Appendix Table. The RIFLE Criteria*		
Stage	Criteria	Urine Output Criteria
Risk for kidney dysfunction	Creatinine level 1.5 times baseline or GFR decrease >25%	<0.5 mL/kg per h for 6 h
Injury to the kidney	Creatinine level 2 times baseline or GFR decrease >50%	<0.5 mL/kg per h for 12 h
Failure of kidney function	Creatinine level 3 times baseline or GFR decrease >75%	<0.3 mL/kg per h for 24 h or anuria for 12 h
Loss of kidney function	Persistent acute kidney failure = complete loss of kidney function for >4 wk	-
End-stage kidney disease	End-stage kidney disease for >3 mo	-

* GFR = glomerular filtration rate; RIFLE = risk, injury, failure, loss, end-stage kidney disease.

Figura1

Bellomo R, Ronco C, Kellum J, et al: The ADQI workgroup. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The second international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI) group. *Crit Care* 2004;8:R204–R212

Table 6 | Pediatric-modified RIFLE (pRIFLE) criteria

	Estimated CCl	Urine output
Risk	eCCl decrease by 25%	<0.5 ml/kg/h for 8 h
Injury	eCCl decrease by 50%	<0.5 ml/kg/h for 16 h
Failure	eCCl decrease by 75% or eCCl <35 ml/min/1.73 m ²	<0.3 ml/kg/h for 24 h or anuric for 12 h
Loss	Persistent failure > 4 weeks	
End stage	End-stage renal disease (persistent failure >3 months)	

eCCl, estimated creatinine clearance; pRIFLE, pediatric risk, injury, failure, loss and end-stage renal disease.

Figura 2

Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, et al: Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007; 71:1028–1035

Tale classificazione non è stata ancora validata però per i neonati.

Nella popolazione dei prematuri VLBW il termine AKI è usato per definire una diminuzione della funzione renale secondaria a un danno e sostituisce la definizione di insufficienza renale acuta usata in passato e il quadro clinico associato ad essa.² Questo cambiamento di definizione dovrebbe favorire la possibilità di diagnosi precoce di danno renale, prima che avvenga la perdita della funzione. Purtroppo non esiste un consenso per quanto riguarda la definizione della funzione renale normale nei neonati prematuri VLBW. Normalmente nella pratica clinica vengono presi come indice di funzionalità renale il valore di creatinina serica e l'urine output.¹ Ma in questi pazienti per diversi motivi, la creatinina non può essere considerata un soddisfacente marker di funzione renale in quanto¹:

- alla nascita e nei primi giorni di vita la creatinina riflette i livelli di creatinina materna

- i valori della creatinina dipendono da massa muscolare, stato di idratazione, età, genere, tutti fattori che a loro volta dipendono dall'età gestazionale del neonato.
- La creatinina potrebbe sovrastimare la funzionalità renale in condizioni di basso GFR, come succede nei primi giorni di vita (anche questo dipende dall'età gestazionale), oppure sottostimare la funzionalità renale, in quanto, nei VLBW è parzialmente riassorbita dal tubulo renale.
- Esistono differenti metodi di valutazione della Creatinina che producono differenti risultati e, in alcuni di questi, i farmaci somministrati e la bilirubina possono influenzare questi valori.¹

È importante sottolineare che la concentrazione plasmatica della creatinina comincia ad aumentare solo dopo che il 25%-50% della funzione renale è persa ed anche l'urine output tende a diminuire piuttosto tardivamente¹. Da questo si deduce che questi due indicatori non permettono una diagnosi precoce di danno e di insufficienza renale e, conseguentemente, di intervento terapeutico tempestivo.

Volendo assumere la creatinina come marker per AKI occorre inoltre tenere in considerazione che il valore della creatinina nei primi giorni di vita dei prematuri VLBW non è stabile. Lo studio di Gallini et al.⁷ eseguito su 83 neonati prematuri (<32 settimane di EG), non esposti a fattori di rischio per danno renale, raggruppati in 4 gruppi per età gestazionale, ha dimostrato come la creatinina plasmatica alla nascita risulta simile in tutti e 4 i gruppi, poi aumenta nei primi giorni di vita fino

ad un picco in 1, 2, 3 o 4 giornata di vita, a seconda dell'età gestazionale, per poi discendere fino a uno steady-state in alcune settimane. Questo studio descrive inoltre una relazione inversamente proporzionale tra i valori della creatinina ed età gestazionale, mostrando che più è bassa l'età gestazionale, maggiore è l'aumento della creatinina e più tardivo il raggiungimento dello steady-state come dimostra la figura 3.

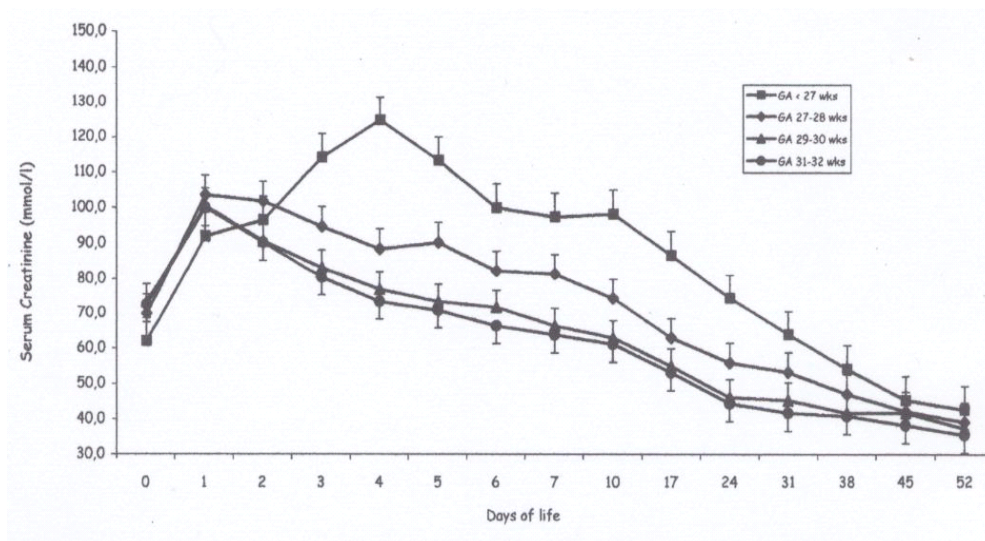


Figura 3

Gallini F, Maggio L, Romagnoli C, Marrocco G, Tortorolo G 2000 Progression of renal function in preterm neonates with gestational age or 32 weeks. *PediatrNephrol* 15:119-124

Questo studio dà un contributo fondamentale nella definizione della normalità per la valutazione della funzione renale nei VLBW. Infatti suggerisce che la definizione di 'funzione renale normale' non può essere valutata usando un valore assoluto di creatinina plasmatica, ma piuttosto considerando una deviazione anomala della curva post-natale della creatinina calcolata secondo l'età gestazionale e i giorni di vita.

Per questo motivo alla Columbia University e' in corso uno studio di definizione dei percentili di normalita' della creatinina nei VLBW, su 192 neonati prematuri, identificati come 'healthy' (neonati con funzione renale normale, decorso clinico non complicato e non esposti a fattori di rischio per danno renale) in una popolazione di 472 inborn VLBW.

Necessita' di nuovi marker precoci di AKI

Per i motivi gia' espressi, e' necessario identificare nuovi marker di danno renale. Il marker ideale per AKI dovrebbe essere facilmente rilevabile in campioni di siero o urine, preferibilmente di urine per evitare eccessivi prelievi di sangue; dovrebbe avere alta sensibilita' e specificita' per AKI e permettere una diagnosi precoce, identificando il danno prima che la funzione renale venga persa. Nella tabella 1 di seguito sono elencate le caratteristiche di un biomarker ideale per AKI⁸.

Tabella1

Caratteristiche biomarker ideale per AKI:
-Non invasivo
-Facilmente rilevabile in campioni di siero o urine
-Alta sensibilita' e specificita' per AKI
-Misurabile rapidamente e in modo affidabile
-Rilevabile precocemente
-Capace di suggerire eziologia, natura e durata dell'insulto
-Marker di danno prima che di perdita funzione renale
-Predittore di severita'e di reversibilita'dell'AKI
-Utile nel monitorare la risposta alle terapie e agli interventi
-Non condizionato da altre variabile biologiche
-Economico

Recentemente sono stati identificati nuovi marker di danno renale nell'adulto: la Cistatina C, l'Interleuchina 18, KIM1, NGAL.

NGAL neutrophil gelatinase-associated lipocalin

In esperimenti animali NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) e' risultata essere un indicatore sensibile di danno renale.⁹ Inducendo un danno renale da ischemia-riperfusion, attraverso occlusione delle arterie renali, in un modello murino, NGAL risulta

aumentare precocemente rispetto alla creatinina che risulta invece invariata⁹. L'immagine 1 dimostra come a 5, 10, 20 minuti dal danno NGAL aumenta rapidamente.

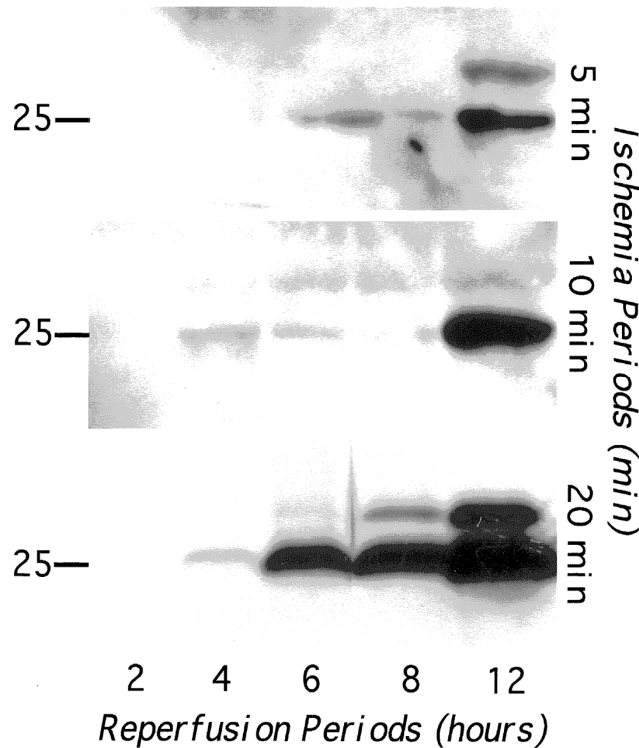


Immagine 1

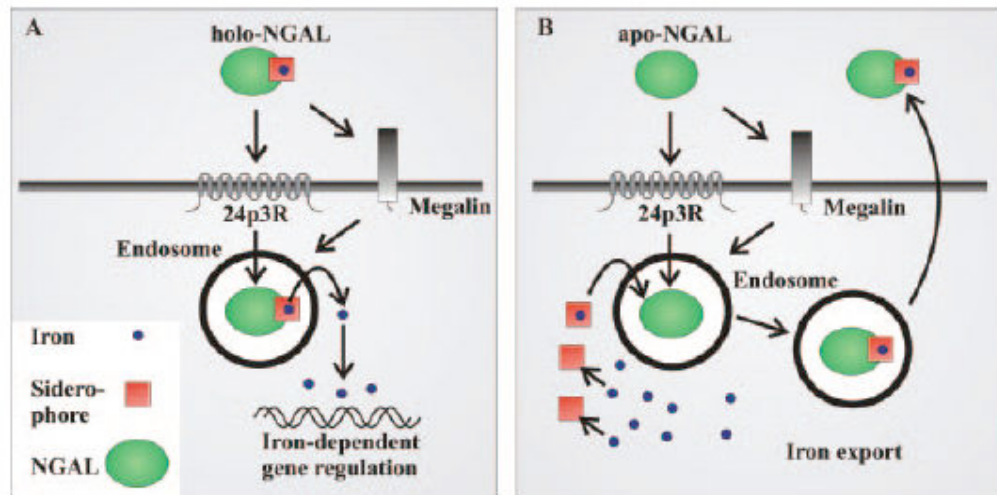
Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P 2003 Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. J Am Soc Nephrol 14:2534–2543

NGAL e' una proteina 25-k-Da appartenente alla superfamiglia delle lipocaline. Questa proteina e' stata identificata per la prima volta nel 1993 nei granuli secondari dei neutrofili¹⁰. Poi e' risultata essere presente, seppur a basse concentrazioni, anche in altri tessuti quali il polmone, il tratto gastrointestinale e nei reni. In particolare si e' visto che questa proteina aumenta quando questi tessuti vanno incontro a ischemia, infiammazione, sepsi, neoplasia^{2,13,14}. Sono tuttora in corso

numerosi studi sul funzionamento di questa proteina e sulle sue implicazioni e significato clinico.

NGAL ha anche un potere antibatterico in quanto interferisce con l'acquisizione di ferro da parte dei batteri¹⁴ (immagine2).

Immagine2



Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J 2007 Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. J Am Soc Nephrol 18:407–413

NGAL interviene anche nel processo di maturazione renale promuovendo la differenziazione epiteliale. In studi su reni embrionali di roditori si è visto che NGAL in associazione con il ferro, permette la conversione di cellule mesenchimali in cellule tubulari epiteliali. La mancata espressione di NGAL in questo processo porta a un aumentata formazione di cisti da parte delle cellule tubulari.^{15,16}

In particolare NGAL è risultata essere presente in due pool: uno sistemico e uno renale. NGAL circolante, nel rene sano, viene filtrata

dal glomerulo per poi essere riassorbita dal tubulo prossimale, ed escreta solo in minima parte (0,1-0,2%) nelle urine.

NGAL urinaria (uNGAL) viene invece prodotta direttamente dai tubuli renali. Studi eseguiti su modelli animali hanno dimostrato come uNGAL viene secreta in maggiori quantita' dall'ansa di Henle e dal dotto collettore in seguito a danno ischemico o settico.² In un recente studio, Kuwabara et al.¹⁷ ha cercato di identificare quale fosse l'origine dell'aumento di uNGAL in caso di AKI, in particolare, da quale pool derivasse NGAL, presente in quantita' maggiori nelle urine. I risultati di questo studio hanno evidenziato come, in presenza di danno renale, uNGAL derivi da entrambi i pool: NGAL filtrata dal glomerulo ma non riassorbita dal tubulo e uNGAL prodotta in maggiore quantita dal rene stesso. Infatti inducendo in un modello animale una nefropatia da somministrazione di farmaco nefrotossico, NGAL precedente marcata, e iniettata nel peritoneo dell'animale (quindi considerata come NGAL del pool sistemico) risulta presente nelle urine in quantita' considerevoli. Inducendo, in un altro esperimento, ostruzione renale di tipo meccanico, NGAL risulta presente a livello del nefrone distale e nelle urine raccolte nella pelvi ostruita. Come Parravicini afferma nella sua Review² in base a questi risultati si puo'dedurre anche che, nel caso di un paziente con funzione renale normale, qualsiasi quantita' di NGAL trovato nelle urine derivera' esclusivamente dal pool renale, anche se in merito a queste conclusioni occorrono ulteriori studi.

Mishra et al¹⁸. e in seguito Bennet et al¹⁹ hanno pubblicato due studi eseguiti su bambini, con eta' da 0 a 7 anni, sottoposti a bypass

cardiaco con funzione renale normale e non esposti a fattori di rischio per danno renale prima dell'intervento. I risultati di questi studi evidenziano che, nel gruppo di pazienti che sviluppano AKI come conseguenza di danno da riperfusione, già a distanza di due ore dal bypass, NGAL aumenta in modo significativo, mentre la creatinina aumenta non prima di 24 ore (Figura 4,5). Nei pazienti invece che non sviluppano AKI, NGAL risulta solo lievemente aumentato, ma non superiore ai valori di normalità. Questi dati suggeriscono che NGAL possa essere veramente un marker precoce di danno renale.

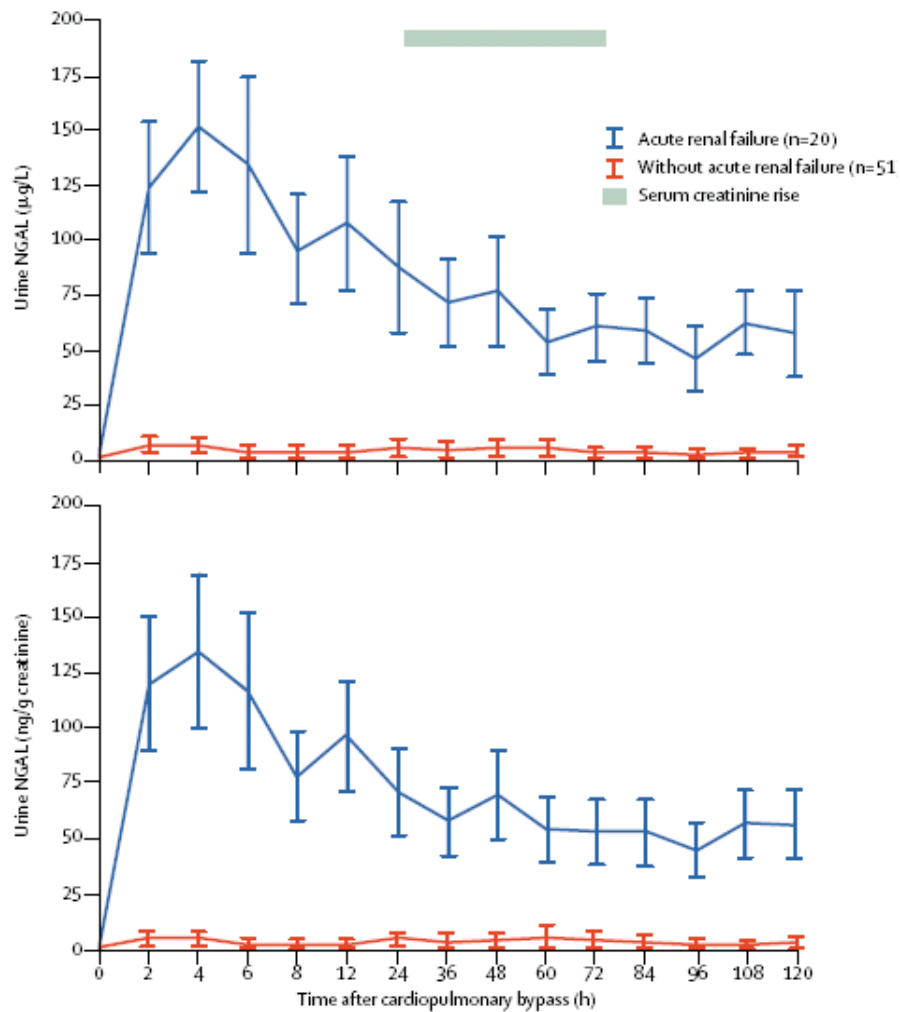


Figura4

Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. 2005 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 365:1231–1238

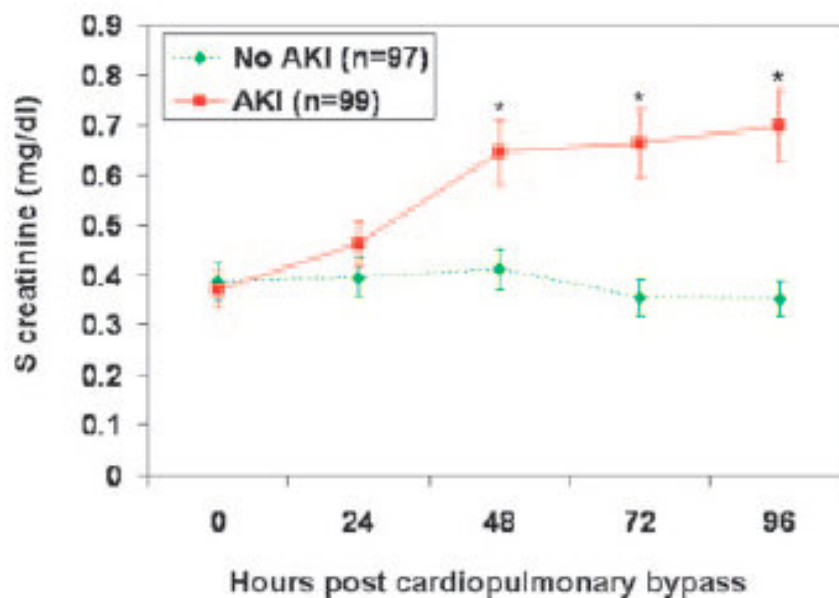


Figura5

Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. Clin J Am Soc Nephrol 2008;3:665-73.

Successivamente uno studio pubblicato da Lavery et al²⁰. ha documentato la presenza di NGAL nelle urine di 20 prematuri VLBW nelle prime due settimane di vita, ed ha suggerito una correlazione negativa tra il valore di questa proteina, il peso alla nascita ed età gestazionale. Un grosso limite di questo studio è che la popolazione è piuttosto eterogenea, includendo pazienti con funzione renale normale, ma anche neonati esposti a fattori di rischio per danno renale, cioè affetti da PDA, RDS, NEC, neonati trattati con farmaci potenzialmente nefrotossici e neonati con insufficienza renale. In 5 di questi pazienti la concentrazione di uNGAL è risultata elevata e 2 di questi hanno presentato oliguria, pertanto è stato ipotizzato che uNGAL possa essere marker di danno renale in questa popolazione di prematuri. Un grosso contributo nello studio di questa proteina lo ha dato il gruppo

della Columbia University di New York, che ha pubblicato i valori di normalita' per uNGAL nei VLBW.^{21,22} Come gia' accennato in precedenza, NGAL interviene nel processo di maturazione renale, che sappiamo completarsi intorno alla 36 settimana di Eta' Gestazionale. Pertanto, ancora prima di valutare la possibilita' che uNGAL sia un marker per danno renale, occorre definire i valori normativi in questa popolazione, in quanto esiste la possibilita' che i valori normali di uNGAL in prematuri con bassa eta' gestazionale siano piu' elevati rispetto a quelli di pazienti pediatrici e adulti. In questo studio²² e' stata arruolata una grossa popolazione di neonati VLBW (50) molto omogenea, includendo solo prematuri con funzione renale normale, decorso clinico non complicato e non esposti a fattori di rischio per danno renale. I risultati di questo studio sono rappresentati nella tabella2. Come si puo' vedere, non si e' trovata una correlazione significativa tra valori di uNGAL, eta' gestazionale e peso alla nascita, come invece aveva riportato lo studio di Lavery²⁰. Una possibile spiegazione di questa differenza sta nel fatto che i prematuri con eta' gestazionale piu' bassa sono piu' soggetti a patologie che possono influenzare la funzione renale, in un processo di nefrogenesi non ancora completato. Pertanto i risultati del gruppo di Cincinnati possono essere condizionati dalla presenza di patologie concomitanti.

Subset	Parameter	UNGAL (ng/ml)	95% Confidence interval*
All (n = 706)	Median	5	(4.7, 5.4)
	95 th %	50	(33.9, 82.2)
	99 th %	120	(92.2, 143.0)
Males (n = 457)	Median	5	(4.8, 5.2)
	95 th %	20	(16.9, 26.0)
	99 th %	40	(25.4, 55.4)
Females (n = 249)	Median	10	(9.0, 11.1)
	95 th %	100	(83.5, 116.3)
	99 th %	135.2	(120.4, 148.4)

Tabella2

Huynh TK, Bateman DA, Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, Sise ME, Bowman TM, Polesana E, Barasch JM 2009 Reference values of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 66:528–532

Come già' accennato in precedenza, rimane la necessita' di trovare un marker precoce per AKI, soprattutto nei prematuri VLBW, per poter diagnosticare e trattare precocemente un danno renale, e prevenire l'instaurarsi di insufficienza renale. In questa popolazione di pazienti uNGAL potrebbe davvero essere il marker ideale, in quanto richiede solo una piccola quantita' di urine, non richiede raccolta sterile delle urine, non necessita di prelievi di sangue, che sono difficili da ottenere

in questi piccoli pazienti e che comportano deplezione della massa sanguigna e necessita' di trasfusione.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

-Obiettivo primario: valutare se uNGAL e' un valido marker di AKI nei prematuri VLBW.

-Obiettivi secondari:

1)Valutare se uNGAL e' un marker precoce di AKI nei prematuri VLBW.

2)Valutare se uNGAL puo' essere considerato indicatore di condizioni patologiche che potenzialmente possono portare a AKI.

Pazienti

In questo studio osservazionale sono stati arruolati i prematuri VLBW nati al Morgan Stanley Children's Hospital of New York Presbyterian, Columbia University Medical Center, da Marzo 2007 a Marzo 2008 e nati al Children's Hospital at Montefiore, Albert Einstein College of Medicine da Novembre 2007 a Marzo 2008.

Criteri di inclusione :

- VLBW (Very Low Birth Weight , peso alla nascita \leq 1500 g)
- AGA (adequate for gestational age)

Criteri di esclusione:

- anomalie congenite maggiori
- anomalie del cariotipo
- trasferiti durante il periodo di studio ad altro istituto

- deceduti nel primo giorno di vita

Volendo assumere come valori normali di riferimento per uNGAL quelli proposti da Huynh et al.²², anche dal nostro studio sono stati esclusi i prematuri SGA (small for gestational age). Nella prima settimana di vita e' stato chiesto ai genitori il consenso per la partecipazione allo studio. Il comitato etico (Institutional review boards) ha approvato lo studio e la documentazione relativa al consenso informato da fornire ai genitori.

Materiali e Metodi

Le urine sono state raccolte tramite urine bag e poste in Eppendorf tube (≥ 0.5 ml), giornalmente dal giorno dell'arruolamento, nella prima settimana di vita, fino al compimento di 32 settimane di eta' gestazionale o fino alla dimissione o alla data del decesso, il primo che occorresse . Le urine sono state poi centrifugate (5 minuti a 5000 rpm) e il supernatante e' stato posto in congelatore alla temperatura di -80° C. La concentrazione di uNGAL e' stata determinata tramite Immunoblot in quanto questo metodo e' risultato essere il piu' preciso e attendibile nell'identificare l'autentico monomero di uNGAL, rispetto alla metodologia con ELISA.²³

Il valore sierico della Creatinina e' stato valutato tramite metodo Jaffe. AKI e' stata definita arbitrariamente come un aumento di Creatinina ≥ 0.3 ml/dl per almeno 48 ore consecutive. Come gia' sottolineato, come valori normali di uNGAL sono stati presi come riferimento quelli pubblicati da Huynh et al.²²

RISULTATI

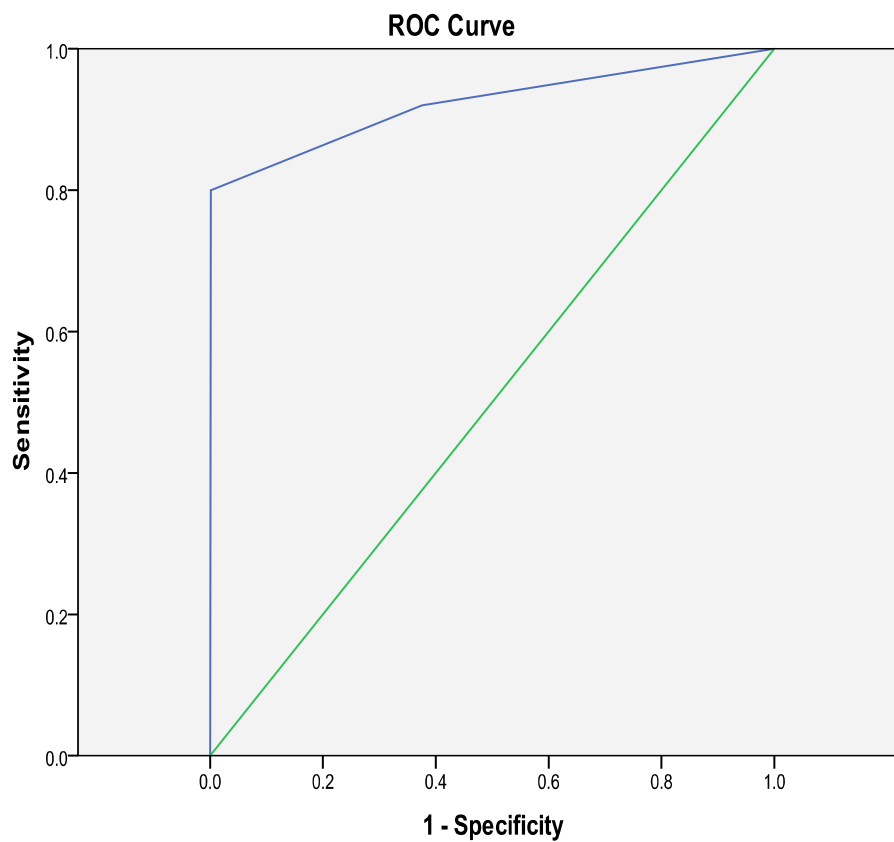
Durante il periodo di studio sono stati inclusi 91 prematuri VLBW, di cui 61 nati alla Columbia e 30 all'ospedale Montefiore. Sono invece stati esclusi dallo studio 122 pazienti per differenti motivi: per 42 neonati non è stato possibile contattare i genitori in tempo utile per l'inizio dello studio; in 29 casi i genitori hanno rifiutato di partecipare; 23 pazienti erano piccoli per età gestazionale; 14 sono deceduti nel primo giorno di vita, 5 presentavano anomalie congenite, 8 sono stati trasferiti ad altro istituto.

Di questi pazienti 14 hanno presentato AKI, secondo i criteri di riferimento.²² In due casi, in corrispondenza dell'aumento della Creatinina non era disponibile il corrispondente valore di uNGAL, pertanto questi pazienti non sono stati presi in considerazione. Tra i 12 pazienti restanti, uno ha presentato 2 episodi di AKI. Durante questi episodi (13 su 12 pazienti), si è evidenziato sempre un corrispondente valore di uNGAL aumentato rispetto ai valori normativi. In 49 pazienti sono stati evidenziati valori di uNGAL aumentati rispetto ai valori normali in assenza di AKI.

La valutazione statistica di questi dati ha mostrato che uNGAL è un marker di AKI con una sensibilità del 100% e una specificità del 36%, con un valore predittivo positivo del 20% e un valore predittivo negativo del 100%. Abbiamo inoltre costruito la ROC curve, con lo scopo di valutare l'attendibilità di uNGAL nell'identificare i casi di AKI. A tale scopo abbiamo preso in considerazione tutti gli episodi di tutti i

pazienti, in cui uNGAL risultava aumentata o al contrario risultava nella norma rispetto ai valori di riferimento, valutando se a questi andamenti corrispondeva ogni volta AKI o assenza di AKI. In totale abbiamo esaminato 1045 episodi. Durante gli episodi di AKI abbiamo considerato il valore di uNGAL a partire dal giorno del rialzo della creatinina e solo per le 48 ore successive, allo scopo di verificare la validità e la tempestività di uNGAL nell'identificare i casi di AKI rispetto a criteri presi attualmente come riferimento per questa patologia. In figura 6 è rappresentata la ROC curve ottenuta dalla rielaborazione di questi dati.

Figura 6



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s):NGAL

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.922	.020	.000	.882	.961

The test result variable(s): NGAL has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

I valori dell'area sottesa alla curva (AUC) e il 95% dei loro intervalli di confidenza sono risultati: 0.92 (0.88,0.96).

L'osservazione dei valori di uNGAL e corrispondente creatinina in pazienti che sviluppano AKI ci ha permesso di identificare i seguenti risultati (Tabella 3):

-in 8 casi il rialzo di uNGAL si verifica diversi giorni prima rispetto all'aumento della creatinina.

-in 2 casi uNGAL e creatinina aumentano lo stesso giorno, ma in uno di questi i valori di uNGAL presentano una curva positiva che precede di qualche giorno il rialzo della creatinina.

-in due casi la creatinina aumenta prima di uNGAL, ma in uno di questi si osserva una curva positiva che precede il rialzo della creatinina.

Tabella 2

M/F	CREATININE'S increase Day Of Life (DOL)	uNGAL's increase Day Of Life (DOL)	
M	DOL 20	DOL 16	BEFORE
M	DOL 5	DOL 3	BEFORE
F	DOL 5	DOL 3	BEFORE
M	DOL 20	DOL 17	BEFORE
M	DOL 28	DOL 24	BEFORE
M	DOL 6	DOL 2	BEFORE
M	DOL 22	DOL 19	BEFORE
M	DOL 7	DOL 2	BEFORE
F	DOL 14	DOL 14	SAME
F	DOL 18	DOL 18, POSITIVE CURVE BEFORE	SAME
F	DOL 25	DOL 27, POSITIVE CURVE BEFORE	AFTER
F	DOL 8	DOL 10	AFTER

Inoltre durante questi episodi di AKI i valori di NGAL sono considerevolmente elevati rispetto ai valori normativi, come riportato nella figura 7.

Figura 7

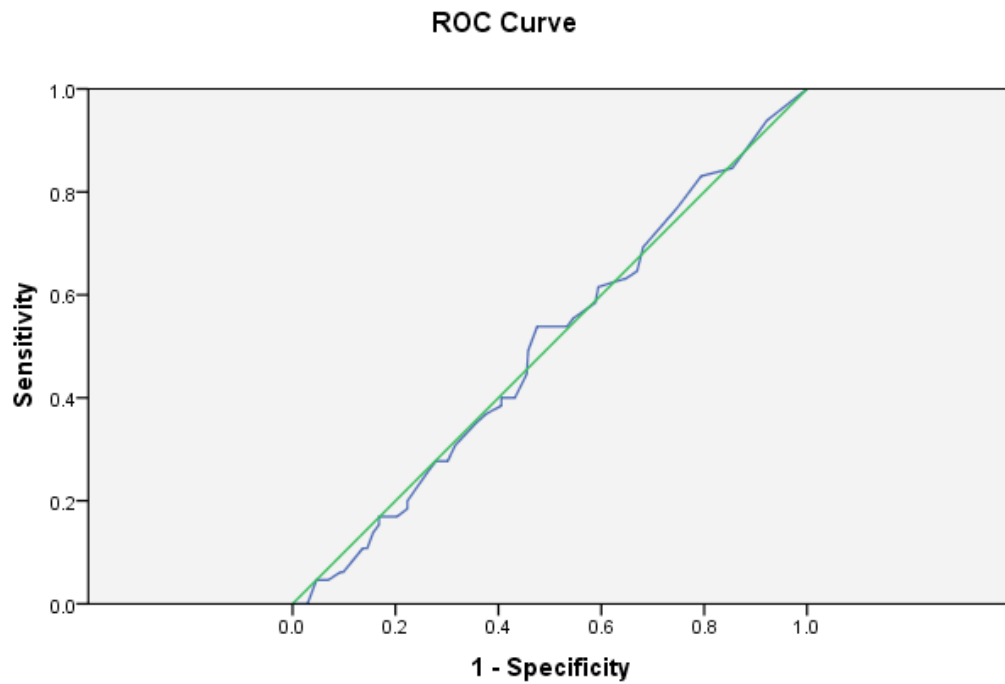
M/F	uNGAL
F	1,200
M	400
M	1,200
F	350
F	300
F	1,500
M	1,000
M	1,000
F	900
M	450
M	90
M	300
M	100

Esaminando gli episodi di rialzo isolato di uNGAL, in assenza di AKI, si e' evidenziata l'associazione con particolari condizioni cliniche quali presenza di sepsi (in 15 casi), NEC(6), presenza di Pervietà del Dotto Arterioso(19), terapia farmacologica per chiusura del dotto (indometacina o ibuprofene) (4), o chiusura chirurgica del Dotto (6). In casi sporadici abbiamo osservato un rialzo di uNGAL senza associazione ad alcuna patologia specifica.

Infine abbiamo costruito la Roc curve per NGAL per aumenti della creatinina pari a 0,1-0,2-0,3mg/dl sostenuti per sole 24 ore (Figura 8,9,10). Le aree sottese alle Roc curve così costruite sono risultate rispettivamente di 0.49 (0.42,0.57) per aumento della Creatinina di 0.1 mg/dl, 0.51(0.36,0.66) per un aumento di 0.2 mg/dl, e 0.62(0.47,0.78) per l'aumento di 0.3 mg/dl sempre per 24 ore.

Figura 8

Creatinine's increase: 0.1 mg/dL for 24h



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s):NGAL

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.499	.038	.976	.424	.573

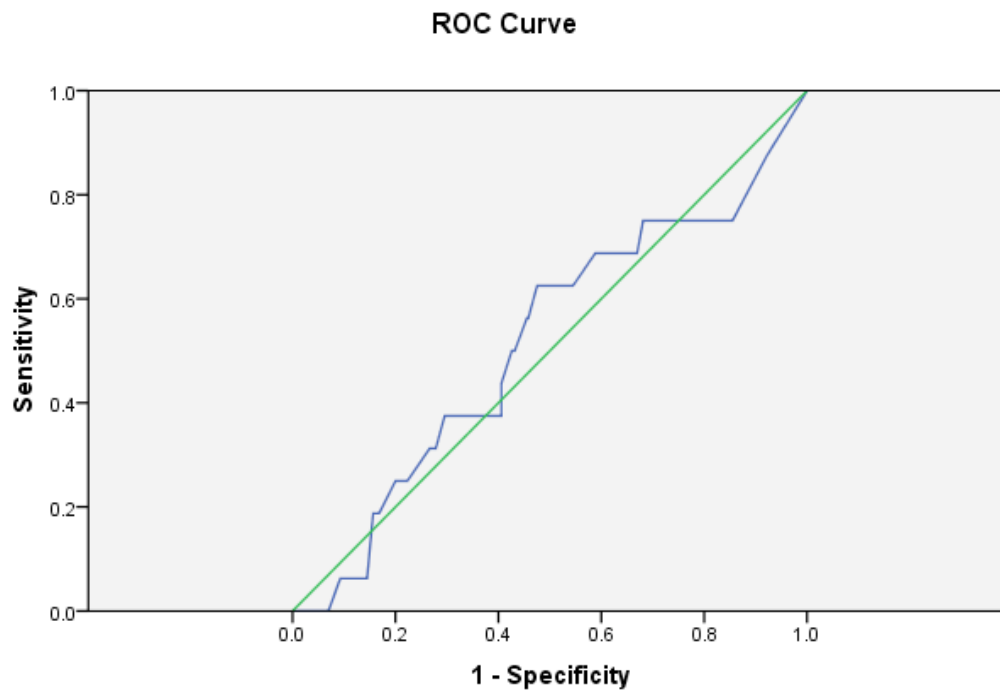
The test result variable(s): NGAL has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Figura 9

Creatinine's increase: 0.2 mg/dl for 24 h



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): NGAL

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.514	.076	.846	.366	.663

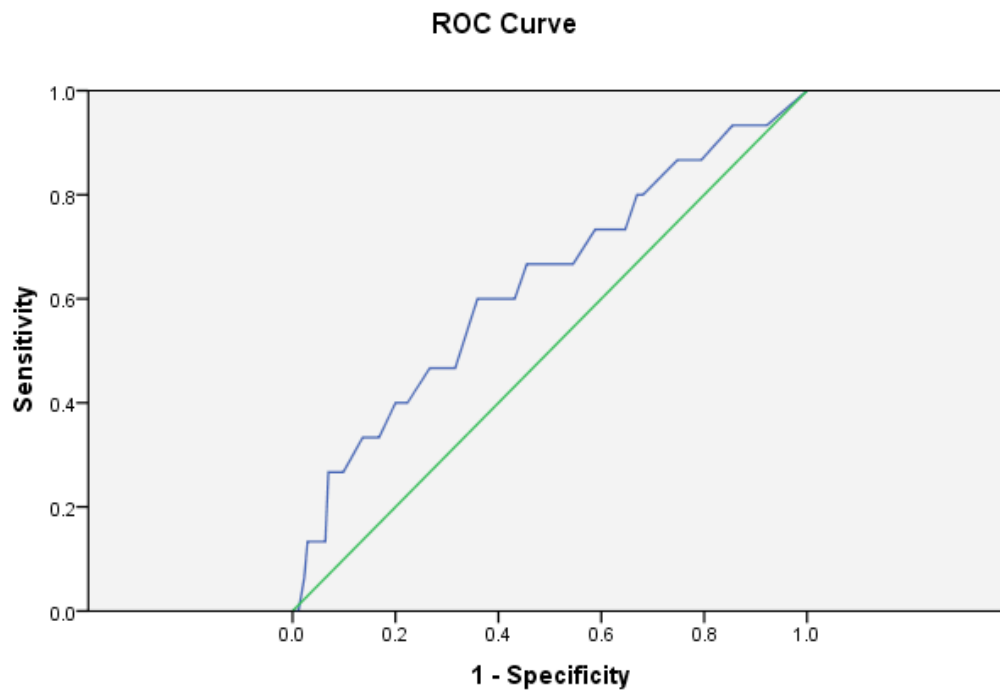
The test result variable(s): NGAL has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Figura 10

Creatinine's increase: 0.3 mg/dl for 24 h



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): NGAL

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.629	.079	.091	.475	.783

The test result variable(s): NGAL has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

DISCUSSIONE

Studi eseguiti su adulti e su bambini sottoposti a intervento di bypass, hanno dimostrato che uNGAL puo' essere considerato un valido marker di AKI.^{18,19} Successivamente e' stato ipotizzato che questa proteina possa essere indicatore di AKI anche nella popolazione dei neonati pretermine VLBW.²⁰

I risultati del nostro studio, eseguito su una popolazione di 91 VLBW, evidenziano una associazione costante tra ogni episodio di AKI e il corrispondente aumento di uNGAL di gran lunga superiore ai valori di riferimento.²² Inoltre, abbiamo osservato che nella maggior parte dei casi, durante l'episodio di AKI, l' aumento di uNGAL precede il rialzo della Creatinina. Infine, l'area sottesa alla Roc curve costruita in base a questi dati, risulta 0.92. Tutto questo suggerisce che uNGAL puo' essere un valido marker per AKI.

Invece, le Roc curve costruite in base all'aumento della creatinina di 0,1-0,2-0,3 mg/dl ma sostenuto solo per 24 ore, non hanno fornito risultati significativi. Questo e' comunque un dato interessante, peche' suggerisce la validita' del nostro criterio di riferimento per identificare i casi di AKI, arbitrariamente definito come un incremento del valore di creatinina ≥ 0.3 mg/dl per almeno 48 ore.

Abbiamo anche osservato numerosi episodi in cui uNGAL aumenta sopra i valori normali in assenza di AKI. Esaminando ogni episodio, i rialzi di questa proteina sono risultati associati nella quasi totalita' dei

casi, a condizioni patologiche caratteristiche di questa popolazione di pazienti quali soprattutto sepsi, NEC, PDA e trattamento farmacologico o chirurgico del dotto arterioso. Questo risultato giustifica la ridotta specificita' di uNGAL (solo 36%) come marker di AKI, rispetto a una sensibilita' e un valore predittivo negativo del 100%, come abbiamo trovato nella valutazione statistica dei nostri dati.

Queste osservazioni suggeriscono che uNGAL puo' essere considerato un valido marker per AKI, ma anche un indicatore di altre patologie che a loro volta possono condizionare la funzionalita' renale.

Una pubblicazione recente di Parravicini et al.²³ ha dimostrato che uNGAL puo' essere marker di sepsi tardiva in VLBW infants. In questo studio, il rialzo di uNGAL e' risultato evidente il giorno stesso in cui veniva eseguita l'emocoltura, anticipando quindi l'aumento della PCR e l'esito dell'emocoltura stessa.

Questo studio va ad avvalorare l'ipotesi che uNGAL, nella popolazione dei VLBW, sia marker specifico per altre patologie che possono portare a danno renale, senza determinare necessariamente una riduzione del GFR e quindi aumento della Creatinina, come risulta dai nostri dati. Dal punto di vista dell'applicazione clinica dei nostri risultati, l'utilizzo di questa proteina potrebbe permettere l'identificazione precoce ed il trattamento adeguato di condizioni patologiche che gravano sulla morbidita' e la mortalita' dei prematuri VLBW. Inoltre si potrebbe prevenire il danno renale irreversibile.

Abbiamo osservato aumenti di uNGAL sopra i limiti della norma non associati a nessuna patologia o trattamento farmacologico particolare.

In alcuni neonati VLBW questo si e' verificato nei primi giorni di vita. Una possibile ipotesi e' un passaggio transplacentare di NGAL materno, pero' attualmente non ci sono studi che dimostrino tale ipotesi. In 2 femmine abbiamo osservato un picco di uNGAL sostenuto solo per 1 giorno ed e' possibile che sia dovuto a contaminazione con altri materiali biologici secreti nell'area perineale.

Abbiamo osservato che durante quasi tutti gli episodi di AKI la concentrazione di NGAL nelle urine aumenta prima dell'innalzamento della creatinina. Questa osservazione, abbastanza preliminare e limitata, dato il numero ridotto dei casi considerati, suggerisce tuttavia che uNGAL potrebbe essere un marker precoce di AKI nei VLBW.

Il nostro studio presenta alcuni limiti. Prima di tutto i nostri risultati sono basati su un numero ridotto di pazienti affetti da AKI.

Inoltre la definizione di AKI e' arbitraria, anche se i risultati da noi riportati sembrano suggerire la sua validita'. Tuttavia sarebbe importante definire valori normativi per la curva della creatinina nel primo mese di vita per i prematuri VLBW. Alla Columbia e' tuttora in corso uno studio su un popolazione di circa 500 VLBW per la valutazione dei valori normali della creatinina in VLBW con funzione renale normale e non sottoposti a fattori di rischio per danno renale.

In conclusione, i risultati di questo studio dimostrano che uNGAL puo' essere considerato un valido candidato come marker di AKI.

Inoltre i nostri dati suggeriscono che uNGAL potrebbe essere utile nella pratica clinica per l'identificazione precoce di AKI e di altre condizioni

patologiche che portano a lieve danno renale senza provocare una diminuzione della funzionalità renale. Occorrono però ulteriori studi su una popolazione più ampia per valutare la correttezza di quest'ultima ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Goldstein SL. Acute Kidney Injury in critically ill newborns: what do we know? What do we need to learn? *Pediatr Nephrol* 2009;24:265-274.
2. Parravicini E. The clinical utility of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the neonatal ICU. *Current Opinion Pediatrics* 2010, 22:146-150.
3. Andreoli SP(2004) Acute renal failure in the newborn. *Semin Perinatol*. 8:112-123.
4. Toth-Heyn P, Drukker A, Guignard JP 2000 The stressed neonatal kidney: from pathophysiology to clinical management of neonatal vasomotor nephropathy. *Pediatr Nephrol* 14:227-239.
5. Coulthard MG, Vernon B 1995 Managing acute renal failure in very lowbirthweightinfants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 73:F187–F192.
6. Choker G, Gouyon. Diagnosis of Acute Renal Failure in Very Preterm Infants. *Biol Neonate* 2004;86:212-216.
7. Gallini F, Maggio L, Romagnoli C, Marrocco G, Tortorolo G 2000 Progression of renal function in preterm neonates with gestational age or 32 weeks. *PediatrNephrol* 15:119–124.
8. Soni S.S., Ronco C., Katz N, Cruz D.N Early Diagnosis of Acute Kidney Injury: The promise of Novel Biomarkers. *Blood Purif* 2009;28:165-174.

9. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P 2003 Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14:2534–2543.
10. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425-10432.
11. Bellomo R, Ronco C, Kellum J, et al: The ADQI workgroup. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The second international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI) group. *Crit Care* 2004;8:R204–R212.
12. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, et al: Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007; 71:1028–1035 Schmidt-Ott.
13. KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J 2006 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:442–449.

14. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J 2007 Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 18:407–413.
15. Yang J, Mori K, Li JY, Barasch J 2003 Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F9–F18.
16. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J 2002 An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 10:1045–1056.
17. Takashige Kuwabara, Kiyoshi Mori, Masashi Mukoyama, Masato Kasahara, Hideki Yokoi, Yoko Saito, Tetsuro Yoshioka, Yoshihisa Ogawa, Hirotaka Imamaki, Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Mitsugu Omata, Noriko Satoh, Akira Sugawara, Jonathan Barasch and Kazuwa Nakao 2009 Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney International* (2009) 75, 285–294.
18. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P 2005 Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 365:1231–1238.

19. Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:665-73.
20. Lavery AP, Meinen-Derr JK, Anderson E, Ma Q, Bennett MR, Devarajan P, Schibler KR 2008 Urinary NGAL in premature infants. *Pediatr Res* 64:423–428.
21. Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, O'Rourke M, Barasch J, Bateman D, 2009 Reference range of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low-birth-weight infants: preliminary data. *Am J Perinatol* 26:437–440.
22. Huynh TK, Bateman DA, Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, Sise ME, Bowman TM, Polesana E, Barasch JM 2009 Reference values of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 66:528–532.
23. Parravicini, SL Nemerofsky, KA Michelson, TK Huynh, ME Sise, DA Bateman, JM Lorenz, AJM Barasch 2010. Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is a Promising Biomarker for Late Onset Culture-Positive Sepsis in Very Low Birth Weight Infants *Pediatric Research* 67:636-640.

